

2006년 8월

석사학위 논문

제III형 상아질 형성부전증에서 Dentin  
Sialophosphoprotein 유전자 돌연변이

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 대 환

# 제III형 상아질 형성부전증에서 Dentin Sialophosphoprotein 유전자 돌연변이

Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) Gene Mutation in a Korean  
Patient with Dentinogenesis Imperfecta type III (Shell teeth)

2006년 8월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 대 환

# 제III형 상아질 형성부전증에서 Dentin Sialophosphoprotein 유전자 돌연변이

지도교수 안 상 건

이 논문을 치의학 석사학위신청 논문으로  
제출함

2006년 4월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

김 대 환

# 김대환의 석사학위 논문을 인준함

위 원 장 조선대학교 교수 김 명 수 인

위 원 조선대학교 교수 윤 정 훈 인

위 원 조선대학교 교수 안 상 건 인

2006년 5월 일(석사)

조선대학교 대학원

# 목 차

표목차

도목차

ABSTRACT

I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	2
A. 환자 .....	3
B. DSPP 유전자의 돌연변이 검색 .....	3
III. 결과 .....	5
A. 병리조직학적 소견 .....	5
B. DSPP의 돌연변이 .....	6
IV. 고찰 .....	7
V.참고문헌 .....	10

## 표 목 차

Table 1. Summery of DSPP mutation .....	7
---	---

## 도목차

Fig. 1. Panoramic radiograph demonstrating the shell-like appearance of the teeth .....	3
Fig. 2. A. Photomicrograph of decalcified section showing thin wall of dentin and large pulp. B. Disruption of odontoblastic layer and reduced numbers of tubules, and irregular pattern of dentinal structures .....	5
Fig. 3. Photomicrograph of undecalcified section showing a layer of enamel of normal thickness and appearance .....	6
Fig. 4. DNA sequencing chromatograms. Arrows indicate the positions of the mutated nucleotide. In exon 4, a G to A transition was identified in codon 243 .....	7

# *ABSTRACT*

## *Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) Gene Mutation in a Korean Patient with Dentinogenesis Imperfecta type III (Shell teeth)*

Dae-Hwan Kim

Advisor : Prof. Sang-Gun Ahn

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

Hereditary dentin defects consist of dentin dysplasia (DD) and dentinogenesis imperfecta (DI). The DI associated with osteogenesis imperfecta has been classified as DI type I, whereas isolated inherited defects have been categorized as DI types II and III. However, whether DI type III should be considered a distinct phenotype or a variation of DI type II is debatable. Recent genetic findings have focused attention on the role of the dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene in the etiology of inherited defects of tooth dentin. We have identified a novel mutation (c.727G → A, p.D243N) at the 243th codon of exon 4 of the DSPP gene in a Korean patient with DI type III. The radiographic and histologic features of the patient revealed the classic phenotype of shell teeth. These findings suggest that DI type II and III are not separate diseases but rather the phenotypic variation of a single disease.

# I. 서론

상아질은 외중간엽(ectomesenchyme) 기원으로 교원질을 함유하고 있는 석회화 조직으로, 치아의 주요 부분을 구성하고 있다. 전반적인 상아질 형성 부전 질환은 상아질 형성 부전증이나 상아질 이형성증과 같이 보통 유전성 질환이다<sup>1)</sup>. 비정상적인 상아질을 초래하는 대표적인 유전성 질환인 상아질 형성 부전증은 몇 가지 아형으로 분류한다. I형은 골형성 부전증의 한 유형과 거의 항상 동반하며, 이 경우 *COL1A1*, *COL1A2*, *COL5A1*, 그리고 *COL2A1*와 같은 교원질 유전자 돌연변이를 보이는 경우이다<sup>1)</sup>. 이와는 달리, II형은 상아질 석회화 부전 질환이다. III형은 소위 각상치 (shell teeth)라 하고, 상아질은 물론 법랑질과 치수까지 영향을 미치는 가장 심한 표현형을 보이는 유형이다<sup>2,3)</sup>.

최근 상아질 형성 부전증이나 상아질 이형성증과 같은 유전성 상아질 질환의 원인으로 *dentin sialophosphoprotein (DSPP)* 유전자에 대한 관심이 집중되고 있다<sup>4)</sup>. 상아질에는 비교원성 상아기질 단백질 dentin sialoprotein (DSP)과 dentin phosphoprotein (DPP)이 있다. 이 두 단백질은 모두 *DSPP* 한 유전자 산물로 *DSPP* 전사와 번역 이후 번역 후 변형과 분리과정을 거쳐 상아기질에 주로 발현되는 DSP와 DPP를 만들게 된다<sup>4)</sup>. II형 상아질 형성부전증에 대한 연관 분석 연구결과 4q21-q23에 지도화 되어 있음이 밝혀졌다<sup>5)</sup>. 특히, 이 부위는 염색체 4q21.3에 위치한 사람 *DSPP* 유전자 (gene locus)와 일치한다<sup>4)</sup>. 아울러 최근에, *DSPP* 유전자 돌연변이가 II형 및 III형 상아질 형성부전증 가족에서 확인된 바 있다<sup>6-8)</sup>. 또한 *Dspp-null* mice 모델에서 III형 상아질 형성부전증과 매우 유사한 상아질 부전 소견을 갖고 있음을 보고한 논문도 있다<sup>3)</sup>.

이 연구에서는 한국인에 발생한 III형 상아질 형성 부전증 환자에서 관찰한 병리조직학적 소견과 *DSPP* 유전자 돌연변이를 확인하여 II형과 III형이 같은 *DSPP* 유전자 돌연변이 결과임을 확인하였고 이 두 질환은 동일한 원인에 의한 것으로 단지 표현형의 차이만 있는 같은 질환임을 제시하는 논문이다.

## II. 재료 및 방법

### A. 환자

환자는 3세1개월 된 한국인 남아로 비교적 건강하고 과거 치과 및 의과 병력은 없었고 혈액학적 검사 결과 정상 범주에 속하였다. 부모와 형을 포함한 가족 중에 치아 이상을 가진 경우도 없었다. 구강검사에서 모든 잔존하는 유치는 황갈색을 보였고 심한 교모가 관찰되었다. 치근단 및 파노라마 방사선 영상 사진에 잔존하는 유치, 특히 유구치는 넓은 치수강과 얇은 상아질 벽을 보였으며 일부 치아는 치근단 병소가 동반하여 관찰되었다 (Fig 1).



**Fig. 1.** Panoramic radiograph demonstrating the shell-like appearance of the teeth.

수복이 불가능하거나 동요도가 심한 치아를 발거한 후 병리조직학적 검사를 시행하였다. 치아의 1/2은 통법에 따라 10% 중성 포르말린에 고정하고 탈회 과정을 거친 후 파라핀에 포매하여 4um 두께로 박절하여 Hematoxylin-Eosin (H-E) 염색을 시행하였다. 나머지 치아의 반은 비탈회 연마표본을 제작하기 위해 사용하였다. 먼저 70% 알코

올에 고정 한 후 glycol-metacrylate resin (Spurr Low-viscosity Embedding media, Polysciences, Warrington, PA, USA)에 포매하였다. 중합시킨 시편을 high-precision diamond disc(Low speed diamond wheel Saw 650, SBT, San clemente, CA, USA)를 사용하여 치아 장축방향으로 절단한 후 lapping and polishing machine(OMNILAP 2000, SBT, San clemente, CA, USA)을 이용하여 30um 두께로 시편을 제작하였다. 이 연구는 조선대학교 치과대학 구강생물학연구소의 윤리규정과 환자 보호자의 승락에 따라 수행하였다.

## B. *DSPP* 유전자의 돌연변이 검색

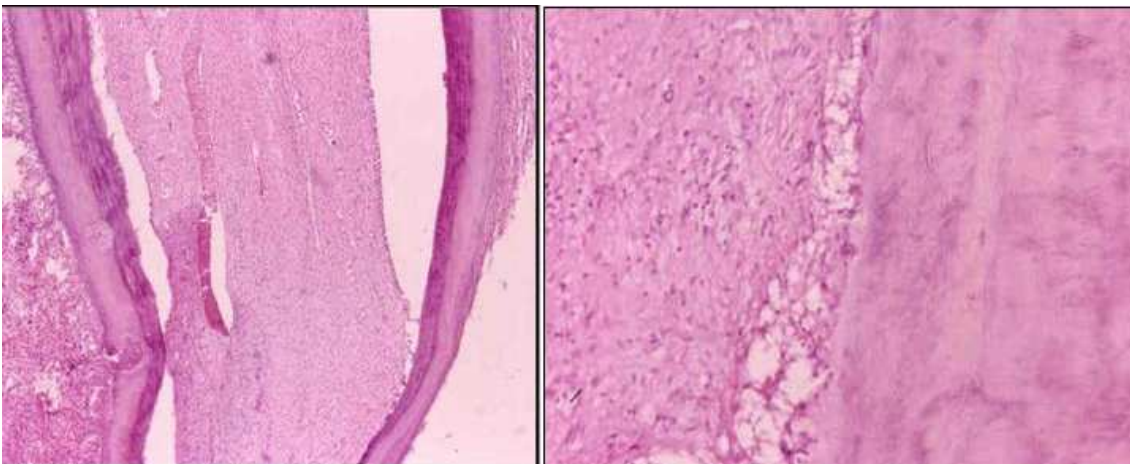
*DSPP* 유전자의 돌연변이를 검색하기 위하여 환자에게서 혈액을 채취한 후 AccuPrep<sup>®</sup> Genomic DNA Extraction Kit (BIONEER, Korea)을 이용하여 Genomic DNA를 추출하였다. *DSPP* 유전자의 exon 1-4를 증폭하기 위하여 다음과 같은 세 쌍의 primer를 제작하였는데 각 primer 쌍은 exon 이외에 이와 인접하는 intron을 포함하도록 제작되었으며 각 primer의 염기서열은 다음과 같다. Exon 1의 sense 5'-TCACCAAGTGAAGGAAGTGG-3'과 antisense 5'-AAAGCCCAAGGTGGATTTTT-3' (565 bp), exon 2의 sense 5'-GATGTCCCCATAACCACACC-3'과 antisense 5'-CTCCATGACTTCTGGGCATT-3' (596 bp), exon3, 4의 sense 5'-CAAGCCCTGTAAGAAGCCACT-3'과 antisense 5'-ACATGGATGCTTGTCATGGT-3' (1482 bp). PCR 반응은 Taq DNA polymerase (TaKaRa, Japan)를 이용하여 다음의 조건으로 수행하였다. 94℃에서 5분, 변성반응을 94℃에서 30초, 결합반응을 56℃에서 30초, 중합반응을 72℃에서 1분 30초간 40주기를 반복하고 마지막 중합반응은 72℃에서 7분간 연장하여 반응시켰다. PCR 반응 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하고 Gel Extraction kit (BIONEER, Korea)을 이용하여 회수하였다. 회수된 PCR 산물은 pGEM-T Easy vector (Promega)에 cloning한 후 sequencing을 수행하였다. Sequencing 분석을 위해서는 PCR 반응에 이

용한 primer들을 사용하였는데 크기가 큰 exon 3-4부분을 분석하기 위해서는 두 개의 sense primer (5'-GGACCATGGGAAAGAAGATG-3'와 5'-GCATCCAGGGACAAGTAAGC-3')와 세 개의 antisense primer (5'-CATTCCTTCTCCCTTGTGA-3', 5'-CCTCGTTTCTACAGGAATTCTCA-3'과 5'-TGGAGGTCTTGTCTCCATCA-3')를 추가로 사용하였다. Nucleotide numbering은 human genomic sequence accession no. AF163151을 따랐다.

### Ⅲ. 연구결과

#### A. 병리조직학적 소견

탈회 표본에서 상아질 벽은 매우 얇아져 있었고 넓은 치수강의 소견을 관찰할 수 있었다 (Fig. 1A). 특히 상아질의 변연측은 구조적으로 잘 형성된 상아기질 층이 관찰되었지만 치수 쪽에 위치한 내측 상아질은 그 기질이 매우 불규칙한 비정상적인 상아기질로 구성되어 있었다 (Fig 2B). 아울러 내측의 비전형적인 구상 상아질 내에는 상아세관의 수가 적고 형태가 이상하며 짧은 세관으로 구성되어 있었다. 치수의 상아모세포층의 배열은 불규칙하게 변형되어 있었다 (Fig 2B). 비탈회 연마 표본에서 법랑질은 정상 두께와 소견을 보였다. 그러나 법랑질 하부의 상아질에는 비정상적인 구간 구형 상아질이 관찰되었다 (Fig 3A, B).



**Fig. 2.** A. Photomicrograph of decalcified section showing thin wall of dentin and large pulp. B. Disruption of odontoblastic layer and reduced numbers of tubules, and irregular pattern of dentinal structures.



**Fig.3.** Photomicrograph of undecalcified section showing a layer of enamel of normal thickness and appearance (A). An abnormal interglobular dentin was observed (B).

## B. *DSPP*의 돌연변이

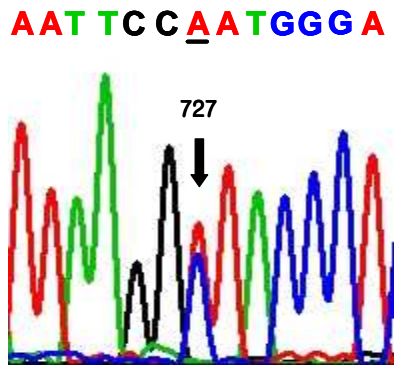
환자의 혈액에서 genomic DNA를 분리하여 *DSPP* 유전자의 exon과 exon-intron 인접부위를 염기서열 분석한 결과 두 군데의 exon과 한 군데의 intron에서 *DSPP* 유전자에서 돌연변이를 확인할 수 있었다. 첫 번째 돌연변이는 exon 4의 243번째 codon이 GAT에서 AAT로 돌연변이 되어 있었는데 이는 Aspartate를 Asparagine으로 바꾸어 주는 point mutation으로 두 개의 *DSPP* alleles 중 한쪽에서 돌연변이가 확인되었다 (Fig. 4). 두 번째 돌연변이는 exon 4의 299번째 codon이 TCA에서 TCG로 돌연변이 되어 있었는데 이는 Serine을 Serine으로 바꾸는 silent mutation으로 *DSPP* 단백질의 아미노산 서열에는 변화가 없었다. 세 번째 돌연변이는 intron 부위에서 확인되었는데

introne 3의 끝에서 33번째 nculeotide가 T에서 C로 돌연변이 되어 있었다 (GAT→GAC, g.1375T→C) (Table 1).

Table 1. Summary of DSPP mutations

	Protein	cDNA	Gene
Intron 3			g. 1375T → C
Exon 4	p. D243N	c. 727G → A	g. 1999A → G
Exon 4	p. S299S	c. 897A → G	g. 2169A → G

Exon 4 : Codon 243  
GAT (Asp) → AAT (Asn)



**Fig. 4.** DNA sequencing chromatograms. Arrows indicate the positions of the mutated nucleotide. In exon 4, a G to A transition was identified in codon 243.

## IV. 고찰

사람 *DSPP* 유전자는 5개의 exon과 4개의 intron으로 구성되어 있다. Exon 1-4는 DSP의 N 말단을, exon 5는 DSP와 DPP의 C 말단을 부호화 한다<sup>9,10</sup>. DPP는 고산성 단백질로 상아질의 비교원성 기질의 주성분이다<sup>9,11</sup>. DSP는 당단백으로 상아질에 소량 존재한다(9-11). DSP와 DPP는 둘 다 치아 특이 단백질로 상아전질에서 상아질로 석회화가 일어날 때 매우 중요한 역할을 할 것으로 믿고 있다. 상아질의 세포외기질의 석회화는 여러 교원 및 비교원성 분자간의 복잡한 상호작용이 필요하다. *DSPP* 유전자는 DSP와 DPP라는 두 단백질을 부호화하는 유전자이다. 이 유전자는 상아모세포와 일시적으로 전범랑모세포(preameloblasts)에서 발현하며 뼈와 귀에서는 적은 수준으로 발현된다<sup>6-8</sup>. 상아질에서, DPP 는 상아질 유기질 성분의 10%에 해당하는 비교원성 단백질의 절반을 구성한다. 이 유전자는 5개의 exon이 있고 exon 2에 번역 개시 codon이 위치한다. Exon 2 와 3 는 signal peptide 부호화 영역이고, DPP codon은 exon 5에 위치한다. DPP는 전상아질이 상아질로 전환되는 석회화에 중요한 것으로 알려져 있다. 반면에 DSP는 proteolytic cleavage 전에 DPP의 활성을 masking하는데 중요한 역할을 하는 것을 제외하고는 그 기능에 대해 잘 알려져 있지 않다<sup>6-11</sup>.

사람 *DSPP* 유전자 돌연변이는 II형 상아질 형성부전증과 II형 상아질 이형성증 가족에서 관찰된 바 있다<sup>5-7,12</sup>. 상아질의 발육장애는 주로 유기질 결함으로 3가지 유형의 상아질 형성부전증과 2가지 유형의 상아질 이형성증으로 분류한다<sup>1</sup>. I형 상아질 형성부전증은 골형성 부전증의 특성을 갖고 있다. II형 상아질 형성 부전증과 II형 상아질 이형성증은 치아의 비정상 색조와 투명도 그리고 치수강과 치근관의 폐쇄를 특징으로 한다<sup>2,7</sup>.

*DSPP* 유전자는 치아의 상아모세포와 전범랑모세포 (preameloblast)에 주로 발현한다. *DSPP* mRNA는 단일 단백질인 *DSPP*로 번역되어 두 종류의 펩타이드인 dentin sialoprotein (DSP)와 dentin phosphoprotein (DPP)로 분리되어 상아기질에 위치한다.

최근 II형 및 III형 상아질 형성 부전증과 II형 상아질 이형성증 환자에서 이 유전자 돌연변이가 확인되었다<sup>6-8,14</sup>). 더욱이, *DSPP* 유전자와 III형 상아질 형성 부전증의 상관성이 *DSPP* knock-out mice에서 사람 III형 상아질 형성 부전증과 표현형이 유사한 특성을 확인하고 *DSPP* 유전자와 III형 상아질 형성 부전증과 연관이 있음 보고한 바 있다<sup>8,13,15</sup>).

이 연구에서 한국인에 발생한 제3형 상아질 형성부전증 환자의 혈액에서 genomic DNA를 분리하여 *DSPP* 유전자의 exon과 exon-intron 인접부위를 염기서열 분석한 결과 두 군데의 exon과 한 군데의 intron에서 *DSPP* 유전자에서 돌연변이를 확인할 수 있었다. 첫 번째 돌연변이는 exon 4의 243번째 codon이 GAT에서 AAT로 돌연변이 되어 있었는데 이는 Aspartate를 Asparagine으로 바꾸어 주는 point mutation으로 두 개의 *DSPP* alleles 중 한쪽에서 돌연변이가 확인되었다. 두 번째 돌연변이는 exon 4의 299번째 codon이 TCA에서 TCG로 돌연변이 되어 있었는데 이는 Serine을 Serine으로 바꾸는 silent mutation으로 *DSPP* 단백질의 아미노산 서열에는 변화가 없었다. 세 번째 돌연변이는 intron 부위에서 확인되었는데 intron 3의 끝에서 33번째 nucleotide가 T에서 C로 돌연변이 되어 있었다 (GAT→GAC, g.1375T→C). 의미가 없다고 생각된 두 번째와 세 번째 돌연변이를 제외하고 표현형의 변화를 가지고 온 아미노산의 변화를 초래한 *DSPP* 유전자 exon 4의 243번째 codon에 새로운 돌연변이 (c.727G → A, p.D243N)를 관찰하였다. 이는 문헌고찰 상 III형 상아질 형성 부전증에서 3번째로 관찰한 *DSPP* 유전자 돌연변이었다<sup>15</sup>). 기존의 보고에서처럼, 돌연변이는 유전자의 DSP domain에 위치하였지만 다른 보고에서 관찰되지 않은 새로운 돌연변이형이었다. 기존의 연구에서 한국인과 Brandywine isolate로 exon 3의 첫 번째 nucleotide의 de novo 돌연변이 (c.52G → T, p.V18F)와 exon 5의 36 bp deletion과 18 bp insertion이 있는 복합 돌연변이었다. 이러한 결과는 상아질 석회화에 있어 Dspp가 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

## V. 참고 문헌

1. Kantaputra PN. Dentinogenesis imperfecta-associated syndromes. *Am J Med Genet* 2001; 15:104(1):75-8.
2. Levin LS, Leaf SH, Jelmini RJ, Rose JJ, Rosenbaum KN. Dentinogenesis imperfecta in the Brandywine isolate (DI type III): clinical, radiologic, and scanning electron microscopic studies of the dentition. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 56(3):267-74.
3. Sreenath T, Thyagarajan T, Hall B, Longenecker G, D'Souza R, Hong S, Wright JT, MacDougall M, Sauk J, Kulkarni AB. Dentin sialophosphoprotein knockout mouse teeth display widened predentin zone and develop defective dentin mineralization similar to human dentinogenesis imperfecta type III. *J Biol Chem* 2003; 4:278(27):24874-80.
4. MacDougall M, Simmons D, Luan X, Nydegger J, Feng J, Gu TT. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. Dentin phosphoprotein DNA sequence determination. *J Biol Chem* 1997; 10:272(2):835-42.
5. Crosby AH, Scherpbier-Heddema T, Wijmenga C, Altherr MR, Murray JC, Buetow KH, Dixon MJ. Genetic mapping of the dentinogenesis imperfecta type II locus. *Am J Hum Genet* 1995 ;57(4):832-9.
6. Xiao S, Yu C, Chou X, Yuan W, Wang Y, Bu L, Fu G, Qian M, Yang J, Shi Y, Hu L, Han B, Wang Z, Huang W, Liu J, Chen Z, Zhao G, Kong X. Dentinogenesis imperfecta 1 with or without progressive hearing loss is associated with distinct mutations in DSPP. *Nat Genet* 2001; 27(2):201-4.
7. Zhang X, Zhao J, Li C, Gao S, Qiu C, Liu P, Wu G, Qiang B, Lo WH, Shen

- Y. DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta Shields type II. *Nat Genet* 2001; 27(2):151-2.
8. Dong J, Gu T, Jeffords L, MacDougall M. Dentin phosphoprotein compound mutation in dentin sialophosphoprotein causes dentinogenesis imperfecta type III. *Am J Med Genet A* 2005 30;132(3):305-9.
9. Ritchie HH, Hou H, Veis A, Butler WT. Cloning and sequence determination of rat dentin sialoprotein, a novel dentin protein. *J Biol Chem* 1994; 4;269(5):3698-702.
10. Yamakoshi Y, Hu JC, Liu S, Zhang C, Oida S, Fukae M, Simmer JP. Characterization of porcine dentin sialoprotein (DSP) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) cDNA clones. *Eur J Oral Sci* 2003 ;111(1):60-7.
11. Qin C, Brunn JC, Baba O, Wygant JN, McIntyre BW, Butler WT. Dentin sialoprotein isoforms: detection and characterization of a high molecular weight dentin sialoprotein. *Eur J Oral Sci* 2003 ;111(3):235-42.
12. Zhang X, Zhao J, Li C, Gao S, Qiu C, Liu P, Wu G, Qiang B, Lo WH, Shen Y. DSPP mutation in dentinogenesis imperfecta Shields type II. *Nat Genet* 2001; 27(2):151-2.
13. Dong J, Gu T, Jeffords L, MacDougall M. Dentin phosphoprotein compound mutation in dentin sialophosphoprotein causes dentinogenesis imperfecta type III. *Am J Med Genet A* 2005 30;132(3):305-9.
14. Kim JW, Nam SH, Jang KT, Lee SH, Kim CC, Hahn SH, Hu JC, Simmer JP. A novel splice acceptor mutation in the DSPP gene causing dentinogenesis imperfecta type II. *Hum Genet* 2004; 115:248.254

15. Kim JW, Hu JC, Lee JI, Moon SK, Kim YJ, Jang KT, Lee SH, Kim CC, Hahn SH, Simmer JP. Mutational hot spot in the DSPP gene causing dentinogenesis imperfecta type II. *Hum Genet* 2005; 116: 186-191.